

PCT
WELTORGANISATION
Internat
INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFL
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT A



AC2

(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ :

G01N 33/532, 33/533, 33/58, C12Q 1/68,
G01N 33/543

A1

WO 9603650A1

Veröffentlichungsdatum:

8. Februar 1996 (08.02.96)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP95/02915

(22) Internationales Anmeldedatum: 24. Juli 1995 (24.07.95)

(30) Prioritätsdaten:

P 44 26 276.0	25. Juli 1994 (25.07.94)	DE
P 44 30 998.8	31. August 1994 (31.08.94)	DE
P 44 30 973.2	31. August 1994 (31.08.94)	DE
P 44 39 345.8	4. November 1994 (04.11.94)	DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US):
BOEHRINGER MANNHEIM GMBH [DE/DE]; Sandhofer
Strasse 112-132, D-68305 Mannheim (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): JOSEL, Hans-Peter
[DE/DE]; Prälattenweg 7, D-82362 Weilheim (DE). FINKE,
Andreas [DE/DE]; Hochfeldstrasse 72, D-82377 Penzberg
(DE). HERRMANN, Rupert [DE/DE]; In der Au 23,
D-82362 Weilheim (DE). HÖSS, Eva [DE/DE]; Am
Mühlberg 1A, D-82319 Starnberg (DE). MARSCHALL,
Andreas [DE/DE]; Schollstrasse 3, D-69469 Weinheim
(DE). SEIDEL, Christoph [DE/DE]; Ammerstrasse 39,
D-82362 Weilheim (DE).

(74) Anwälte: WEICKMANN, H. usw.; Kopernikusstrasse 9, D-
81679 München (DE).

(81) Bestimmungsstaaten: AU, CA, CN, FI, JP, KR, NO, NZ, US,
europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB,
GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).

Veröffentlicht

Mit internationalem Recherchenbericht.

(54) Title: OLIGOMER CARRIER MOLECULES IN WHICH MARKER GROUPS AND HAPTENS ARE SELECTIVELY INCORPORATED

(54) Bezeichnung: OLIGOMERE TRÄGERMOLEKÜLE MIT DEFINIERT EINGEBAUTEN MARKIERUNGSGRUPPEN UND HAPTENEN

(57) Abstract

The present invention concerns novel conjugates, process for manufacturing them, and the use of such conjugates as antigens in immunological detection processes or in DNA diagnostic procedures.

(57) Zusammenfassung

Die vorliegende Erfindung betrifft neue Konjugate, Verfahren zu deren Herstellung sowie die Verwendung dieser Konjugate als Antigene in immunologischen Nachweisverfahren oder zur DNA-Diagnostik.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AT	Österreich	GA	Gabon	MR	Mauretanien
AU	Australien	GB	Vereinigtes Königreich	MW	Malawi
BB	Barbados	GE	Georgien	NE	Niger
BE	Belgien	GN	Guinea	NL	Niederlande
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	NO	Norwegen
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	NZ	Neuseeland
BJ	Benin	IE	Irland	PL	Polen
BR	Brasilien	IT	Italien	PT	Portugal
BY	Belarus	JP	Japan	RO	Rumänien
CA	Kanada	KE	Kenya	RU	Russische Föderation
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KG	Kirgisistan	SD	Sudan
CG	Kongo	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SE	Schweden
CH	Schweiz	KR	Republik Korea	SI	Slowenien
CI	Côte d'Ivoire	KZ	Kasachstan	SK	Slowakei
CM	Kamerun	LJ	Liechtenstein	SN	Senegal
CN	China	LK	Sri Lanka	TD	Tschad
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	TG	Togo
CZ	Tschechische Republik	LV	Lettland	TJ	Tadschikistan
DE	Deutschland	MC	Monaco	TT	Trinidad und Tobago
DK	Dänemark	MD	Republik Moldau	UA	Ukraine
ES	Spanien	MG	Madagaskar	US	Vereinigte Staaten von Amerika
FI	Finnland	ML	Mali	UZ	Usbekistan
FR	Frankreich	MN	Mongolei	VN	Vietnam

Oligomere Trägermoleküle mit definiert eingebauten Markierungsgruppen und Haptenen

BESCHREIBUNG

Die vorliegende Erfindung betrifft neue Konjugate, Verfahren zu deren Herstellung sowie die Verwendung dieser Konjugate als Antigene in immunologischen Nachweisverfahren oder zur DNA-Diagnostik.

Der Nachweis von Immunglobulinen in Körperflüssigkeiten, insbesondere in Humanseren, wird zur Diagnostik von Infektionen mit Mikroorganismen, insbesondere Viren, wie etwa HIV, Hepatitis-Viren, etc. verwendet. Das Vorhandensein von spezifischen Immunglobulinen in der untersuchten Probe wird üblicherweise durch Reaktion mit einem oder mehreren Antigenen, die mit den spezifischen Immunglobulinen reagieren, nachgewiesen. Verfahren zur Bestimmung von spezifischen Immunglobulinen in der Probeflüssigkeit müssen sensitiv, zuverlässig, einfach und schnell sein.

Ein weiteres immunologisches Verfahren ist der kompetitive Immunoassay, bei dem der qualitative und quantitative Nachweis eines Analyten dadurch erfolgt, daß ein mit dem Analyten immunologisch analoges Hapten und der Analyt um Bindungsstellen auf einem Rezeptor, z.B. einem Antikörper konkurrieren. Das Analytenanalogon wird dabei im allgemeinen in markierter oder an eine Festphase bindefähiger Form eingesetzt.

In den letzten Jahren wurden zunehmend Nachweissysteme auf Basis nicht-radioaktiver Markierungsgruppen entwickelt, bei denen das Vorhandensein eines Analyten, z.B. eines spezifischen Antikörpers, in der untersuchten Probe mit Hilfe optischer (z.B. Lumineszenz oder Fluoreszenz), NMR-aktiver oder Metall-präzipitierender Detektionssysteme bestimmt werden konnte.

EP-A-0 307 149 offenbart einen Immuntest für einen Antikörper, bei dem zwei rekombinante Polypeptide als Antigene verwendet werden, von denen eines an einer festen Phase immobilisiert ist, und das andere eine Markierungsgruppe trägt, wobei beide rekombinanten Antigene in unterschiedlichen Organismen exprimiert werden, um die Spezifität des Nachweises zu erhöhen.

EP-A-0 366 673 offenbart ein Verfahren zum Nachweis von Antikörpern in einer Probe, bei dem ein Antikörper durch Reaktion mit einem gereinigten, markierten Antigen und dem gleichen gereinigten Antigen in einer Festphasen-gebundenen Form nachgewiesen wird. Als Antigen wird beispielsweise humanes IgG offenbart.

EP-A-0 386 713 beschreibt ein Verfahren zum Nachweis von Antikörpern gegen HIV unter Verwendung von zwei festen Trägern, wobei an beide festen Träger verschiedene HIV-Antigene immobilisiert werden, die jeweils mit einem Aliquot einer Probe und einem markierten HIV-Antigen in Kontakt gebracht werden, wobei das Vorhandensein von Antikörpern durch eine positive Reaktion in mindestens einem der Tests nachgewiesen wird. Als HIV-Antigene werden rekombinant hergestellte Polypeptide offenbart.

EP-A-0 507 586 beschreibt ein Verfahren zur Durchführung eines immunologischen Tests für ein spezifisches Immunglobulin, bei dem eine Probe mit zwei zur Bindung des Immunglobulins fähigen Antigenen in Kontakt gebracht wird, wobei das erste Antigen eine zur Bindung an einen festen Träger geeignete Gruppe trägt, und das zweite Antigen eine Markierungsgruppe trägt. Die Markierungsgruppe kann eine direkte Markierungsgruppe sein, z.B. ein Enzym, ein Chromogen, ein Metallteilchen, oder auch eine indirekte Markierungsgruppe, d.h. die am Antigen angebrachte Markierungsgruppe kann mit einem Rezeptor für die Markierungsgruppe, der wiederum eine signalerzeugende Gruppe trägt, reagieren. Als Beispiel für eine solche indirekte Markierungsgruppe wird ein Fluoresceinderivat genannt, dessen Rezeptor ein Antikörper ist, der wiederum mit einem Enzym gekoppelt ist. Als Antigene werden Polypeptide, wie etwa das Hepatitis B-Oberflächenantigen offenbart. In dieses

Antigen werden durch Derivatisierung SH-Gruppen eingeführt, mit denen das Fluorescein gekoppelt wird.

EP-A-0 507 587 offenbart ein spezifisch zum Nachweis von IgM Antikörpern geeignetes Verfahren, bei dem die Probe mit einem markierten Antigen, das gegen den nachzuweisenden Antikörper gerichtet ist, und einem zweiten Antikörper, der ebenfalls gegen den nachzuweisenden Antikörper gerichtet und an eine Festphase bindefähig ist, inkubiert wird.

EP-A-0 199 804 und EP-A-0 580 979 offenbaren ein immunologisches Nachweisverfahren unter Verwendung von Antigenen, die mit lumineszierenden Metallchelatgruppen, insbesondere mit Ruthenium- und Osmiumchelatgruppen markiert sind. Als Antigene werden Immunglobuline verwendet, die durch Reaktion mit aktivierten Metallkomplexen statistisch markiert werden.

EP-A-0 178 450 offenbart Metallchelate, insbesondere Rutheniumkomplexe, an die ein immunologisch aktives Material, beispielsweise Antikörper, gekoppelt werden kann. Die Kopplung erfolgt durch statistische Reaktion des immunologisch reaktiven Materials mit dem Metallchelate.

EP-A-0 255 534 offenbart einen Lumineszenz-Immunoassay unter Verwendung eines Metallchelate-gekoppelten Antigens oder Antikörpers. Die Kopplung erfolgt beispielsweise durch statistische Reaktion eines Metallchelate-Aktivesterderivats mit einem Antikörper.

WO 90/05301 offenbart ein Verfahren zum Nachweis und zur quantitativen Bestimmung von Analyten durch Elektrochemilumineszenz unter Verwendung von lumineszierenden Metallchelaten, die an (i) einen zugesetzten Analyten, (ii) einen Bindepartner des Analyten oder (iii) eine reaktive Komponente, die mit (i) oder (ii) binden kann, gekoppelt sind. Die Lumineszenzmessung erfolgt nach Bindung der Metallchelate an aktivierte und gegebenenfalls magnetische Mikropartikel.

Bei den aus dem Stand der Technik bekannten immunologischen Nachweisverfahren für Antikörper werden üblicherweise Polypeptid-Antigene verwendet, die meist durch rekombinante DNA-Methoden erzeugt wurden. Beim Einsatz derartiger Polypeptid-Antigene können jedoch Probleme auftreten. So können rekombinante Polypeptide oft nur in Form von Fusionspolypeptiden erzeugt werden, bei denen der Fusionsanteil zu falsch positiven Resultaten im Test führen kann. Weiterhin zeigen durch rekombinante Expression erzeugte Polypeptide oft eine nur geringe Stabilität in der Probelösung und neigen zu Aggregation. Ein weiterer Nachteil ist, daß oft keine selektive und reproduzierbare Einführung von Markierungsgruppen in solche Polypeptide möglich ist.

Überdies ist die Herstellung rekombinanter Polypeptidantigene mit hohen Kosten verbunden und es können größere Schwankungen in der immunologischen Reaktivität bei verschiedenen Chargen rekombinanter Polypeptide auftreten.

Auch bei kompetitiven Immunoassays, die sehr hohe Anforderungen an die Sensitivität und Präzision stellen, können beim Nachweis von nur in sehr geringen Konzentrationen vorliegenden Analyten wie etwa Estradiol oder Testosteron, insbesondere bei Nachweis-systemen auf Basis von Elektrochemilumineszenz die geforderten unteren Nachweisgrenzen unter Verwendung bekannter Antigene nur sehr schwer erreicht werden.

Das der vorliegenden Erfindung zugrundeliegende Problem war somit die Bereitstellung eines Verfahrens, bei dem auf einfache und effiziente Weise Antigene für immunologische Tests erzeugt werden können, wobei die Nachteile der aus dem Stand der Technik bekannten Antigene mindestens teilweise beseitigt werden. Weiterhin soll das Verfahren eine selektive und reproduzierbare Einführung von Markierungsgruppen in die Antigene ermöglichen.

Dieses Problem wird gelöst durch Konjugate, umfassend einen polymeren Träger mit maximal 100 monomeren Einheiten, der

gekoppelt an reaktive Seitengruppen 1-10 Haptenmoleküle und 1-10 Markierungs- oder Festphasenbindungsgruppen enthält, wobei die monomeren Einheiten aus Aminosäuren, Nukleotiden und peptidischen Nukleinsäuren ausgewählt sind.

Durch Verwendung der erfindungsgemäßen Konjugate, die 1-10 Haptenmoleküle und eine definierte Anzahl von Markierungs- oder Festphasenbindungsgruppen enthalten, als Antigene in einem immunologischen Nachweisverfahren kann überraschenderweise eine wesentlich höhere Sensitivität und Präzision bei einer gleichzeitig verringerten unteren Nachweisgrenze gegenüber bekannten monomeren und multimeren Antigenen erreicht werden. Darüber hinaus lassen sich die erfindungsgemäßen Konjugate in sehr einfacher Weise durch Festphasensynthese, z.B. eine Peptid-Festphasensynthese, aufbauen. Hierzu können an jeweils vorbestimmten Positionen monomere Einheiten, z.B. Aminosäurederivate, eingebaut werden, die mit einem Haptenmolekül oder einer Markierungs- bzw. Festphasenbindungsgruppe derivatisiert sind. Überdies kann an Positionen der Trägerkette, an denen sich Monomere mit freien funktionellen Gruppen befinden, nach Abschluß der Festphasensynthese ein zusätzlicher selektiver Einbau von Haptenen oder Markierungs- bzw. Festphasenbindungsgruppen erfolgen. Dadurch ist ein definierter und reproduzierbarer Einbau von Haptenmolekülen und Markierungs- bzw. Festphasenbindungsgruppen in das Konjugat möglich. Die Abstände zwischen den einzelnen Gruppen auf dem Konjugat können genau festgelegt und gegebenenfalls variiert werden. Durch Auswahl des Abstandes von Markierungsgruppen auf dem Konjugat kann das Signalquenching gering gehalten werden, so daß die Signalstärke proportional mit der Zahl von Markierungsgruppen zunimmt. Auch eine festgelegte räumliche Orientierung von Markierungsgruppen trägt, z.B. bei helikalen Trägern, zur Verbesserung der Signalstärke bei. Vorzugsweise betragen die Abstände zwischen Markierungsgruppen daher 3-6 oder/und 13-16 monomere Einheiten bei helikalen Trägern, z.B. einzel- oder insbesondere doppelsträngige Nukleinsäuren.

Das polymere Trägermolekül, das das Rückgrat des Konjugats

bildet, hat eine Länge von maximal 100 monomeren Einheiten, vorzugsweise von 3 - 80 monomeren Einheiten und besonders bevorzugt von 5 - 60 monomeren Einheiten.

Die monomeren Einheiten sind aus Aminosäuren, Nukleotiden und peptidischen Nukleinsäuren ausgewählt. Vorzugsweise umfaßt der polymere Träger eine aus Aminosäuren aufgebaute Peptidkette, vorzugsweise eine lineare Peptidkette. Der Träger kann jedoch auch eine aus Nukleotiden oder Nukleotidanaloga aufgebaute Nukleinsäurekette umfassen, an deren reaktiven Seitengruppen Haptenmoleküle und Markierungs- bzw. Festphasenbindungsgruppen angekoppelt sind. Diese Nukleinsäurekette kann als Einzel- oder als Doppelstrang vorliegen. Bei doppelsträngigen Nukleinsäureträgern findet man oft eine Erhöhung der Signalstärke von Markierungsgruppen, z.B. eine verbesserte Quantenausbeute bei Fluoreszenzmarkierungsgruppen.

Weiterhin kann der polymere Träger aus peptidischen Nukleinsäuren (PNA) aufgebaut sein. Peptidische Nukleinsäuren umfassen ein Polyamidrückgrat aus gleichen oder *verschiedenen monomeren Einheiten der Formel

$(\text{CH}_2)_k\text{-CHR}'\text{-N}[\text{CO}-(\text{CH}_2)_i\text{-L}]\text{-CH}_2\text{-(CH}_2)_m\text{-NH-CO-}$, wobei L aus der Gruppe, bestehend aus Wasserstoff, Phenyl, natürlich vorkommenden Nukleobasen und nicht natürlich vorkommenden Nukleobasen ausgewählt ist, R' aus der Gruppe, bestehend aus Wasserstoff und den Seitenketten natürlich oder nicht natürlich vorkommender Aminosäuren, vorzugsweise α -Aminosäuren ausgewählt ist, k und m jeweils unabhängig 0 oder 1 sind und i unabhängig von 0 bis 5 ist. Die Haptenmoleküle und Markierungs- bzw. Festphasenbindungsgruppen können an die Nukleobasen- oder/und Aminosäureseitenketten der peptidischen Nukleinsäure gekoppelt sein. Peptidische Nukleinsäuren und ihre Herstellung sind in WO92/20703 beschrieben. Auf diese Offenbarung wird hiermit Bezug genommen.

Auch bei peptidischen Nukleinsäuren kann der Träger als Einzel- oder Doppelstrang vorliegen. Besonders bevorzugt sind doppel-

strängige Träger mit mindestens einem PNA-Strang, z.B. einem PNA-Strang und einem Nukleinsäurestrang, z.B. einem DNA-Strang.

Das Konjugat enthält 1-10 Haptenmoleküle, vorzugsweise 1-6 Haptenmoleküle und besonders bevorzugt 1 oder 2 Haptenmoleküle. Das Hapten ist vorzugsweise ein immunologisch reaktives Molekül mit einer Molekularmasse von 100-2000 Da. Derartige Haptene können z.B. aus pharmakologischen Wirkstoffen, wie etwa Antibiotika, Opiaten, Amphetaminen, Barbituraten, Cytostatika (z.B. Gentamicin, Tobramycin, Vancomycin etc.), Paracetamol, Salicylaten, Phenytoin, Chinin und Chininderivaten, Theophyllin etc., Hormonen und Metaboliten wie etwa Sterinen, Gallensäuren, Sexualhormonen (z.B. Estradiol, Estriol, Testosteron, Progesteron, Pregnenolon und Derivate davon), Corticoiden (z.B. Cortisol, Corticosteron, Cortison und Derivate davon), Cardenoliden und Cardenolid-Glycosiden (z.B. Digoxin, Digoxigenin, Strophantin, Bufadienolide etc.) Steroid-Sapogeninen, Steroidalkaloiden, Peptidhormonen, Creatinin, Schilddrüsenhormonen (z.B. T_3 , T_4), Neurotransmittern (z.B. Serotonin, Cholin, γ -Aminobuttersäure), Vitaminen und Mediatoren wie etwa Prostaglandinen, Leukotrienen, Leuko-En-diinen und Thromboxanen ausgewählt werden.

Andererseits kann das Hapten auch aus immunologisch reaktiven Peptidepitopen ausgewählt werden, die eine Länge von vorzugsweise bis zu 30 Aminosäuren besitzen. Derartige Peptidepitope können beispielsweise aus pathogenen Organismen, z.B. Bakterien, Viren und Protozoen oder aus Autoimmun-Antigenen, stammen. Beispielsweise können die immunologisch reaktiven Peptidepitope aus viralen Antigenen, z.B. den Aminosäuresequenzen von HIV I, HIV II oder Hepatitis C-Virus (HCV), stammen.

Außerdem kann das Hapten auch aus Nukleinsäuren mit einer Länge von vorzugsweise bis zu 50 Nukleotiden ausgewählt sein, die zu einer Nukleinsäuresequenz, die in der Probe nachgewiesen werden soll, komplementär sind. Schließlich kann das Hapten auch aus peptidischen Nukleinsäuren mit einer Länge von bis zu 50 Monomereinheiten ausgewählt sein.

Weiterhin enthält das erfindungsgemäße Konjugat 1-10, vorzugsweise 2-8 Markierungs- oder Festphasenbindungsgruppen. Bevorzugte Beispiele für Markierungsgruppen sind lumineszierende Metallchelate und Fluoreszenzmarkierungen. Bevorzugte Beispiele für Festphasenbindungsgruppen sind Biotin und Biotinanaloga, wie etwa Desthiobiotin und Imminobiotin, die eine spezifische Reaktion mit Streptavidin oder Avidin eingehen können.

Die Haptenmoleküle und Markierungs- bzw. Festphasenbindungsgruppen sind vorzugsweise über reaktive Amino- oder/und Thiolseitengruppen, besonders bevorzugt über reaktive primäre Aminoseitengruppen an die Trägerkette gekoppelt. Derartige Seitengruppen können durch Einbau von entsprechenden Monomeren, z.B. Aminosäuren wie etwa Lysin, Ornithin, Hydroxylysin oder Cystein, in die Trägerkette erzeugt werden.

In bestimmten Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung kann es bevorzugt sein, wenn ein Spacer zwischen das Hapten bzw. die Markierungs- oder Festphasenbindungsgruppe und die Trägerkette eingebaut wird. Der Spacer ist vorzugsweise flexibel und hat eine Kettenlänge von vorzugsweise 3-30 Atomen. Besonders bevorzugt enthält der Spacer hydrophile Gruppen, z.B. Oxyalkylen- oder/und Hydroxy-Seitengruppen.

Bevorzugte Markierungsgruppen sind lumineszierende Metallchelate, d.h. Metallchelate, die eine nachweisbare Lumineszenzreaktion erzeugen. Der Nachweis dieser Lumineszenzreaktion kann beispielsweise durch Fluoreszenz- oder durch Elektrochemilumineszenzmessung erfolgen. Das Metall dieser Metallchelate ist beispielsweise ein Übergangsmetall oder ein Seltenerdenmetall. Vorzugsweise ist das Metall Ruthenium, Osmium, Rhenium, Iridium, Rhodium, Platin, Indium, Palladium, Molybdän, Technetium, Kupfer, Chrom oder Wolfram. Besonders bevorzugt sind Ruthenium, Iridium, Rhenium, Chrom und Osmium. Am meisten bevorzugt ist Ruthenium.

Die Liganden, die zusammen mit dem Metall das Metallchelat bilden, sind üblicherweise Polydentat-Liganden, d.h. Liganden mit

mehreren Koordinationsstellen. Polydentat-Liganden umfassen beispielsweise aromatische und aliphatische Liganden. Geeignete aromatische Polydentat-Liganden beinhalten aromatische heterocyclische Liganden. Bevorzugte aromatische heterocyclische Liganden sind N-haltige Polyheterocyclen wie etwa z.B. Bipyridyl, Bipyrazyl, Terpyridyl und Phenanthrolyl. Diese Liganden können beispielsweise Substituenten wie etwa Alkyl, substituiertes Alkyl, Aryl, substituiertes Aryl, Alkyl, Carboxylat, Carboxyaldehyd, Carboxamid, Cyano, Amino, Hydroxy, Imino, Hydroxycarbonyl, Aminocarbonyl, Amidin, Guanidinium, Ureid, schwefelhaltige Gruppen, phosphorhaltige Gruppen und die Carboxylatester von N-Hydroxysuccinimid umfassen. Bevorzugte Liganden enthalten C₂-C₃-Alkylenoxy-, C₂-C₃-Alkylenthio- und C₂-C₃-Alkylenaminogruppen, insbesondere Ethylenoxygruppen. Das Chelat kann auch einen oder mehrere Monodentat-Liganden enthalten. Beispiele von Monodentat-Liganden umfassen Kohlenmonoxid, Cyanide, Isocyanide, Halogenide und aliphatische, aromatische und heterocyclische Phosphine, Amine, Stilbene und Arsine.

Besonders bevorzugt wird das lumineszierende Metallchelate ausgewählt aus Metallchelaten mit Bipyridyl- oder Phenanthrolyl-Liganden. Beispiele geeigneter Metallchelate und ihre Herstellung sind in EP-A-0 178 450, EP-A-0 255 534, EP-A-0 580 979 und WO 90/05301 beschrieben. Auf diese Offenbarung wird hiermit Bezug genommen. Am meisten bevorzugte Metallchelate sind Ruthenium-(bipyridyl)₃-Chelate. Diese Chelate sind in Form von Aktivesterderivaten kommerziell erhältlich, z.B. von Igen Inc. (Rockville, MD, USA).

Bei Verwendung eines lumineszierenden Metallkomplexes, der durch eine Elektrochemilumineszenz-Reaktion nachweisbar ist, als Markierungsgruppe hat sich der Einbau von mindestens einem positiven oder/und negativen Ladungsträger, z.B. Amino- oder Carboxylatgruppen, in die Trägerkette oder/und in den Spacer zwischen Metallkomplex und Trägerkette als günstig erwiesen. Besonders bevorzugt enthält die Trägerkette eine oder mehrere negative Ladungen, die z.B. durch Einbau von Glutaminsäure oder

Asparaginsäure während der Synthese erzeugt werden können. Auch bei anderen Markierungs- bzw. Festphasenbindungsgruppen, z.B. Fluoreszenzgruppen oder Biotin, kann der Einbau von Ladungsträgern in die Trägerkette oder/und in einen Spacer bevorzugt sein.

Ein weiteres Beispiel für bevorzugte Markierungsgruppen sind Fluoreszenzmarkierungen, wie etwa Fluorescein, Cumarin, Rhodamin, Resorufin, Cyanin und Derivate davon. Bei Verwendung von fluoreszierenden Markierungsgruppen hat sich eine helikale Struktur des Trägerrückgrats als günstig erwiesen, welche die Fluoreszenzmarkierungsgruppen hinsichtlich Raumorientierung und Abstand fixiert, um eine Fluoreszenzlöschung durch einen Energietransfer zu verhindern. Beispiele für Monomere, die eine geeignete helikale Struktur ergeben, sind Prolin oder ein peptidisches Nukleinsäurederivat mit einer Prolinseitengruppe.

Die Herstellung der erfindungsgemäßen Konjugate erfolgt durch ein Verfahren, bei dem man einen polymeren Träger, vorzugsweise einen Peptidträger aus monomeren Einheiten an einer Festphase synthetisiert, wobei man (a) während der Synthese an vorbestimmten Positionen des Trägers Monomerderivate einführt, die kovalent mit Haptenmolekülen oder/und Markierungs- bzw. Festphasenbindungsgruppen gekoppelt sind, oder/und (b) nach der Synthese aktivierte Haptenmoleküle oder/und Markierungs- bzw. Festphasenbindungsgruppen an reaktive Seitengruppen des Trägers koppelt.

Bei Variante (a) des erfindungsgemäßen Verfahrens wird während der Festphasensynthese ein Monomerderivat eingeführt, das kovalent, vorzugsweise über eine primäre Aminoseitengruppe einer basischen Aminosäure wie Lysin oder Ornithin oder über eine Thiolseitengruppe einer Aminosäure wie Cystein mit einem Haptenmolekül oder/und einer Markierungs- bzw. Festphasenbindungsgruppe gekoppelt ist. Die Herstellung entsprechender Monomerderivate kann beispielsweise durch Kopplung eines aktivierten Haptenmoleküls oder einer aktivierten Markierungs- bzw. Festphasenbindungsgruppe, z.B. eines Aktivesterderivats an

eine freie primäre Aminogruppe oder eines Maleimidderivats an eine freie Thiolgruppe von gegebenenfalls partiell geschützten Monomerderivaten, z.B. Aminosäurederivaten, erfolgen. In Abb. 1 ist ein bevorzugtes Metallchelat-gekoppeltes Lysinderivat gezeigt. In Abb. 2 ist ein biotinyliertes Lysinderivat gezeigt.

Der Begriff "Aktivester" im Sinne der vorliegenden Erfindung umfaßt aktivierte Estergruppen, die mit freien Aminogruppen von Peptiden unter solchen Bedingungen reagieren können, daß keine störenden Nebenreaktionen mit anderen reaktiven Gruppen des Peptids auftreten können. Vorzugsweise wird als Aktivesterderivat ein N-Hydroxysuccinimidester verwendet. Neben den N-Hydroxysuccinimidestern können auch analoge p-Nitrophenyl-, Pentafluorphenyl-, Imidazolyl- oder N-Hydroxybenzotriazolester verwendet werden.

Die Herstellung von Hapten-, Markierungsgruppen- und Festphasenbindungsgruppenderivaten, die sich für den Einbau in Oligonukleotidträger eignen, ist bei Theisen et al. (Tetrahedron Letters 33 (1992), 5033-5036) am Beispiel des Fluoreszenzfarbstoffs 5-Carboxyfluorescein beschrieben, der zu einem Phosphoramiditderivat umgesetzt wird. Dieses Phosphoramiditderivat kann an das 5'-Ende oder/und das 3'-Ende von Oligonukleotiden oder innerhalb der Oligonukleotidsequenz eingebaut werden.

Gemäß Variante (b) des erfindungsgemäßen Verfahrens erfolgt die Kopplung der einführenden Gruppe nach Abspaltung von Schutzgruppen der zur Festphasensynthese verwendeten Monomerderivate vorzugsweise an Amino- oder/und Thiol-Seitengruppen, besonders bevorzugt an primäre Aminoseitengruppen des Trägers.

Vorzugsweise erfolgt die Einführung von Haptenen und Markierungs- bzw. Festphasenbindungsgruppen gemäß Variante (a), d.h. durch Verwendung von mit der jeweils einzuführenden Gruppe gekoppelten Monomerderivaten während der Festphasensynthese. Gemäß dieser Variante können beispielsweise lumineszierende Metallchelate, Biotin oder Peptidhaptene ohne weiteres eingeführt werden. Bei

empfindlichen Fluoreszenzfarbstoffen oder -markierungen oder anderen Haptenen, wie etwa Steroiden, ist diese Vorgehensweise jedoch weniger bevorzugt, da diese Substanzen durch die bei der Festphasensynthese herrschenden Bedingungen zerstört werden können. In diesem Falle erfolgt die Herstellung der Konjugate vorzugsweise gemäß Verfahrensvariante (b), d.h. durch nachträgliche Kopplung an das fertige Trägermolekül. Natürlich ist eine Kombination der Verfahrensvarianten (a) und (b) möglich.

Auch die Einführung zwei verschiedener Gruppen gemäß Variante (b), d.h. nach Beendigung der Synthese, z.B. eines Haptens und einer Markierungsgruppe oder eines Hapten und einer Festphasenbindungsgruppe, ist möglich. Hierzu kann das Verfahren nach Variante (b) beispielsweise derart durchgeführt werden, daß die erste einzuführende Gruppe an Amino- und die zweite einzuführende Gruppe an Thiolseitengruppen des Trägermoleküls gekoppelt wird. Andererseits können beide einzuführenden Gruppen jeweils selektiv an vorbestimmte primäre Aminoseitengruppen des Trägers gekoppelt werden, wobei an Positionen des Trägers, an denen eine Kopplung mit Haptenmolekülen erfolgen soll, ein Monomerderivat mit einer ersten Schutzgruppe für die Aminoseitengruppe verwendet wird, und an Positionen des Trägers, an denen eine Kopplung mit Markierungs- bzw. Festphasenbindungsgruppen erfolgen soll, ein Monomerderivat mit einer zweiten Schutzgruppe für die Aminoseitengruppe verwendet wird und die erste und die zweite Schutzgruppe so ausgewählt werden, daß eine selektive Schutzgruppenabspaltung und demzufolge eine selektive Kopplung in zwei Reaktionsschritten möglich ist. Hierzu können die erste und zweite Schutzgruppe aus säurelabilen Aminoschutzgruppen, wie etwa Boc bzw. säurestabilen Schutzgruppen, wie etwa Phenylacetyl ausgewählt werden.

Bei dem erfindungsgemäßen Verfahren wird das Trägermolekül mit der gewünschten Monomersequenz an einer Festphase hergestellt. Die Herstellung von Peptidträgern erfolgt vorzugsweise mit einem kommerziellen Peptid-Synthesegerät (z.B. die Geräte A 431 oder A 433 von Applied Biosystems). Die Synthese erfolgt nach

bekannten Methoden, vorzugsweise ausgehend vom Carboxylterminus des Peptids unter Verwendung von Aminosäurederivaten. Vorzugsweise werden Aminosäurederivate eingesetzt, deren für die Kupplung benötigte Amino-Endgruppe mit einem Fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc)-Rest derivatisiert ist. Reaktive Seitengruppen der eingesetzten Aminosäuren enthalten Schutzgruppen, die nach Beendigung der Peptidsynthese ohne weiteres abspaltbar sind. Bevorzugte Beispiele hierfür sind Schutzgruppen, wie etwa Triphenylmethyl (Trt), t-Butylether (tBu), t-Butylester (OtBu), tert.-Butoxycarbonyl (Boc), 2,2,5,7,8-Pentamethylchroman-6-sulfonyl (Pmc) oder Phenylacetyl.

Die Aminoseitenketten von Lysinresten oder anderen Aminosäurederivaten mit primären Aminoseitengruppen, die sich an Positionen des Peptids befinden, an denen ein Hapten oder eine Markierung eingeführt werden soll, sind gemäß Variante (a) kovalent mit der einzuführenden Gruppe gekoppelt.

Neben den 20 natürlichen Aminosäuren kann das Peptid auch artefizielle Aminosäuren, wie etwa β -Alanin, γ -Aminobuttersäure, ϵ -Aminocapronsäure, Norleucin oder Ornithin enthalten. Diese artefiziellen Aminosäuren werden analog wie die natürlichen Aminosäuren für die Synthese in geschützter Form eingesetzt.

Gemäß Variante (b) des erfindungsgemäßen Verfahrens erfolgt nach Beendigung der Synthese die Einführung des Haptens bzw. der Markierung durch Umsetzung des Peptids nach Schutzgruppenabspaltung mit der jeweils gewünschten aktivierten Gruppe, die mit freien primären Aminogruppen des Peptids reagiert. Pro freie primäre Aminogruppe werden vorzugsweise 1,5 bis 4 Äquivalente Aktivester eingesetzt. Anschließend wird das Reaktionsprodukt aufgereinigt, vorzugsweise durch HPLC. Die Einführung von zwei unterschiedlichen aktivierten Gruppen gemäß Variante (b) gelingt durch Verwendung von zwei selektiv abspaltbaren Schutzgruppen, wie oben erläutert.

Das Peptidrückgrat des Konjugats besitzt eine nicht immunologisch

reaktive Aminosäuresequenz, d.h. eine Aminosäuresequenz, die bei der vorgesehenen Anwendung des Konjugats als Antigen in einem immunologischen Nachweisverfahren die Durchführung des Tests nicht beeinträchtigt.

Andererseits kann das Rückgrat des Trägermoleküls auch aus Nukleotiden oder peptidischen Nukleinsäuren aufgebaut sein. Die Synthese eines Oligonukleotidträgermoleküls kann in einem kommerziellen DNA-Synthesegerät erfolgen. Die Haptenmoleküle und die Markierungs- bzw. Festphasenbindungsgruppen werden vorzugsweise als Phosphoramiditderivate eingeführt (Theisen et al., supra; Applied Biosystems, User Bulletin 67, FAM Amidite, Mai 1992) oder/und nachträglich an freie reaktive Seitengruppen gekoppelt. Die Synthese von Trägermolekülen auf Basis peptidischer Nukleinsäuren erfolgt analog einer Festphasenpeptidsynthese, z.B. gemäß der in WO92/20703 beschriebenen Methode. Die Einführung von Haptenmolekülen oder Markierungs- bzw. Festphasenbindungsgruppen kann entsprechend den für Peptid- und Oligonukleotidträger beschriebenen Methoden erfolgen.

Ein Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist auch die Verwendung der Konjugate als Antigene in einem immunologischen Verfahren, wenn das Haptenmolekül ein immunologisch reaktives Molekül ist, oder zur DNA-Diagnostik, wenn das Hapten eine Nukleinsäure ist.

Konjugate, die mehr als 1 Haptenmolekül enthalten, können in immunologischen Nachweisverfahren als Polyhaptene eingesetzt werden.

Eine bevorzugte Ausführungsform der Erfindung betrifft die Verwendung der Konjugate in einem immunologischen Verfahren zur Bestimmung von spezifischen Antikörpern in einer Probeflüssigkeit. Vorzugsweise werden solche Antikörper bestimmt, die auf eine Infektion durch Mikroorganismen, wie etwa Bakterien, Viren oder Protozoen, hinweisen. Besonders bevorzugt werden gegen Viren gerichtete Antikörper, z.B. gegen HIV oder Hepatitis-Viren gerichtete Antikörper bestimmt. Die Probeflüssigkeit ist vorzugs-

weise Serum, besonders bevorzugt humanes Serum. Weiterhin ist bevorzugt, daß die erfindungsgemäßen Konjugate bei einem immunologischen Verfahren im Brückentestformat eingesetzt werden.

Ein Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist somit ein Verfahren zur immunologischen Bestimmung eines spezifischen Antikörpers in einer Probeflüssigkeit, welches dadurch gekennzeichnet ist, daß man (a) die Probeflüssigkeit mit mindestens einem erfindungsgemäßen Konjugat, das gegen den zu bestimmenden Antikörper gerichtet ist, inkubiert und (b) den Antikörper über eine Bindung mit dem Peptid nachweist.

Das erfindungsgemäße immunologische Bestimmungsverfahren kann an sich nach jedem bekannten Testformat erfolgen, z.B. in einem homogenen Immunoassay mit einer einzigen Reaktionsphase oder in einem heterogenen Immunoassay mit mehr als einer Reaktionsphase. Vorzugsweise wird ein heterogenes Testformat verwendet, bei dem das Vorhandensein des Antikörpers in Anwesenheit einer Festphase nachgewiesen wird. Eine Ausführungsform dieses Testformats ist das sogenannte Doppelantigen-Brücken-Testkonzept. Hierbei wird die Probeflüssigkeit in Gegenwart einer reaktiven Festphase mit zwei gegen den zu bestimmenden Antikörper gerichteten Antigenen inkubiert, wobei das erste Antigen eine Markierungsgruppe trägt und das zweite Antigen an die Festphase gebunden ist oder in einer an die Festphase bindefähigen Form vorliegt. Das erste oder/und das zweite Antigen ist ein erfindungsgemäßes Konjugat. Der zu bestimmende Antikörper in der Probeflüssigkeit wird gegebenenfalls nach Abtrennen der Festphase von der Inkubationsflüssigkeit durch Bestimmung der Markierung in der Festphase oder/und in der flüssigen Phase nachgewiesen. Vorzugsweise ist das erste Antigen ein mit einem lumineszierenden Metallchelat oder einer Fluoreszenzgruppe markiertes Konjugat. Das zweite Antigen ist vorzugsweise mit Biotin markiert und ist an eine Festphase bindefähig, die mit Streptavidin oder Avidin beschichtet ist.

Die Testdurchführung beinhaltet vorzugsweise ein Mischen der

Probeflüssigkeit mit dem ersten markierten Antigen und dem festphasenseitigen zweiten Antigen, um einen markierten, immobilisierten Komplex aus erstem Antigen, Antikörper und festphasengebundenem zweiten Antigen zu erhalten. Gegenüber anderen Testformaten zum Nachweis von Antikörpern führt das Brückentestformat sowohl zu einer Verbesserung der Sensitivität, d.h. es werden alle Immunglobulinklassen, wie etwa IgG, IgM, IgA und IgE, erkannt, als auch der Spezifität, d.h. es wird die unspezifische Reaktivität verringert.

Eine zweite bevorzugte Ausführungsform der Erfindung betrifft die Verwendung der Konjugate in einem kompetitiven Immunoassay. Kompetitive Immunoassays werden im allgemeinen zum Nachweis von niedermolekularen Analyten verwendet und können prinzipiell in zwei Testformaten, dem "labelled antibody" Format und dem "labelled analog" Format durchgeführt werden. Beim "labelled antibody" Format wird die den nachzuweisenden Analyten enthaltende Probeflüssigkeit mit einem an eine Festphase bindefähigen Hapten, das mit dem Analyten immunologisch konkurriert, und einen markierten, gegen das Hapten und den Analyten gerichteten Rezeptor, z.B. einen Antikörper, markiert. Bei diesem Testformat ist die an die Festphase gebundene Markierung umgekehrt proportional zur Konzentration des Analyten. Beim "labelled analog" Format wird die den nachzuweisenden Analyten enthaltende Probeflüssigkeit mit einem markierten, mit dem Analyten immunologisch konkurrierenden Hapten und einem gegen den Analyten und das Hapten gerichteten Rezeptor, der an eine Festphase bindefähig ist, inkubiert. Die Menge an festphasengebundenem markiertem Hapten ist dann der Konzentration an freiem, zu bestimmendem Analyten umgekehrt proportional.

Ein Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist somit ein Verfahren zum Nachweis eines Analyten in einer Probeflüssigkeit nach dem Prinzip des kompetitiven Immunoassay im "labelled analog" Format, dadurch gekennzeichnet, daß man (a) die Probeflüssigkeit in Gegenwart einer reaktiven Festphase mit einem erfindungsgemäßen Konjugat, das eine Markierungsgruppe enthält, und einem Rezeptor,

der an die Festphase gebunden oder zur Bindung an eine Festphase fähig ist und eine spezifisch immunologische Reaktion mit dem Analyten und der Hapten- komponente des Konjugats eingehen kann, inkubiert, (b) die Festphase gegebenenfalls von der Inkubationsflüssigkeit abtrennt und (c) das Vorhandensein oder/und die Menge des Analyten in der Probeflüssigkeit durch Messung der Markierungs- komponente des Konjugats in der Festphase oder/und in der Inkubationsflüssigkeit bestimmt. Als immobilisierbaren Rezeptor verwendet man vorzugsweise einen biotinylierten Antikörper bzw. ein biotinyliertes Antikörperfragment und als reaktive Festphase eine mit Streptavidin oder Avidin beschichtete Festphase.

Noch ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Verfahren zum Nachweis eines Analyten in einer Probeflüssigkeit nach dem Prinzip des kompetitiven Immunoassay im "labelled antibody" Format, dadurch gekennzeichnet, daß man (a) die Probe- flüssigkeit in Gegenwart einer reaktiven Festphase mit einem erfindungsgemäßen Konjugat, das eine Festphasenbindungsgruppe enthält, und einem Rezeptor, der eine Markierungsgruppe trägt und eine spezifisch immunologische Reaktion mit dem Analyten und der Haptenkomponente des Konjugats eingehen kann, inkubiert, (b) die Festphase gegebenenfalls von der Inkubationsflüssigkeit abtrennt und (c) das Vorhandensein oder/und die Menge des Analyten in der Probeflüssigkeit durch Messung der Markierungs- komponente des Rezeptors an der Festphase oder/und in der Inkubationsflüssigkeit bestimmt. Vorzugsweise verwendet man ein biotinyliertes Konjugat und eine mit Streptavidin oder Avidin beschichtete Festphase. Als markierten Rezeptor verwendet man vorzugsweise einen Antikörper bzw. ein Antikörperfragment.

Der Nachweis von lumineszierenden Metallchelatgruppen erfolgt vorzugsweise durch Elektrochemilumineszenz, wobei lumineszierende Spezies elektrochemisch an der Oberfläche einer Elektrode erzeugt werden. Der Nachweis der Lumineszenz kann qualitativ oder/und quantitativ erfolgen. Beispiele zur Durchführung von Lumineszenz- Assays finden sich in EP-A-0 580 979, WO 90/05301, WO 90/11511 und WO 92/14138. Auf die dort offenbarten Verfahren und Vor-

richtungen für Lumineszenz-Assays wird hiermit Bezug genommen. Die Festphase in Elektrochemilumineszenz-Assays besteht vorzugsweise aus Mikropartikeln, besonders bevorzugt magnetischen Mikropartikeln, die mit einer Beschichtung versehen sind, die mit dem festphasenseitigen zweiten Antigen wechselwirkt. Vorzugsweise sind die Mikropartikel mit Streptavidin beschichtet.

Die Elektrochemilumineszenz-Messung wird vorzugsweise in Gegenwart eines Reduktionsmittels für den Metallkomplex durchgeführt, z.B. einem Amin. Bevorzugt sind aliphatische Amine, insbesondere primäre, sekundäre und tertiäre Alkylamine, deren Alkylgruppen jeweils ein bis drei Kohlenstoffatome aufweist. Besonders bevorzugt ist Tripropylamin. Das Amin kann jedoch auch ein aromatisches Amin, wie Anilin oder ein heterocyklisches Amin sein.

Weiterhin kann gegebenenfalls als Verstärker ein nichtionisches oberflächenaktives Mittel, z.B. ein ethoxyliertes Phenol vorhanden sein. Derartige Substanzen sind beispielsweise kommerziell unter den Bezeichnungen Triton X100 oder Triton N-401 erhältlich.

Andererseits kann der Nachweis der lumineszierenden Metallchelatgruppe auch durch Fluoreszenz erfolgen, wobei das Metallchelat durch Bestrahlung mit einem Licht der geeigneten Wellenlänge angeregt und die daraus resultierende Fluoreszenzstrahlung gemessen wird. Beispiele zur Durchführung von Fluoreszenz-Assays finden sich in EP-A-0 178 450 und EP-A-0 255 534. Auf diese Offenbarung wird hiermit Bezug genommen.

Der Nachweis von Fluoreszenzgruppen, die ebenso wie die lumineszierenden Metallchelate zu den bevorzugten Markierungsgruppen der erfindungsgemäßen Konjugate gehören, kann - wie zuvor ausgeführt - durch Anregung und Messung der Fluoreszenz auf bekannte Weise erfolgen.

Noch ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein

immunologisches Reagenz, das mindestens ein erfindungsgemäßes markiertes oder festphasenbindefähiges Konjugat enthält. Ein Reagenz zur immunologischen Bestimmung eines spezifischen Antikörpers nach dem Prinzip des Doppelantigen-Brückentests enthält (a) ein markiertes erfindungsgemäßes Konjugat oder/und (b) ein weiteres erfindungsgemäßes Konjugat, das an eine Festphase gebunden ist oder in einer an eine Festphase bindefähigen Form vorliegt.

Ein Reagenz zur Bestimmung eines Analyten, vorzugsweise eines niedermolekularen Analyten nach dem Prinzip des kompetitiven Immunoassays enthält ein markiertes Konjugat ("labelled analog"-Format) oder ein festphasenbindefähiges Konjugat ("labelled antibody"-Format), das mit dem zu bestimmenden Analyten immunologisch um die Bindung an einen Rezeptor konkurriert. Vorzugsweise enthält das Reagenz für einen kompetitiven Immunoassay räumlich getrennt vom erfindungsgemäßen Konjugat entweder einen markierten Rezeptor ("labelled antibody"-Format) oder einen festphasenbindefähigen Rezeptor ("labelled analog"-Format), der mit dem zu bestimmenden Analyten und dem erfindungsgemäßen Konjugat eine immunologische Reaktion eingehen kann.

Die Erfindung wird weiterhin durch die folgenden Beispiele und Abbildungen erläutert. Es zeigen:

- Abb. 1 ein Metallchelate-Lysin-Derivat,
- Abb. 2 ein Biotin-Lysin-Derivat,
- Abb. 3 ein erfindungsgemäßes Konjugat
- Abb. 4 ein Vergleichskonjugat.

Beispiel 1

Herstellung eines Metallchelate-Lysin-Derivats

6 mmol des Rutheniumkomplexes $\text{Ru}(\text{Bipyridin})_2$ (Bipyridin-CO-N-hydroxysuccinimidester) gemäß EP-A-0 580 979 wurden in 50 ml Dimethylformamid gelöst und dazu eine Lösung von α -Fmoc-Lysin getropft. Nach Abziehen des Lösungsmittels wurde der Rückstand

in wenig Aceton gelöst, mit 300 ml Chloroform versetzt und kurz zum Sieden erhitzt. Nach Abtrennen des Lösungsmittels wurde die in Abb. 1 gezeigte Verbindung als Feststoff erhalten.

Beispiel 2

Herstellung von Metallchelate-markierten und biotinylierte Peptiden

Die Metallchelate-markierten bzw. biotinylierten Peptide wurden mittels Fluorenylmethyloxycarbonyl-(Fmoc)-Festphasenpeptidsynthese an einem Batch-Peptidsynthesizer, z.B. von Applied Biosystems A431 oder A433, hergestellt. Dazu wurden jeweils 4.0 Äquivalente der in Tabelle 1 dargestellten Aminosäurederivate verwendet:

Tabelle 1:

A	Fmoc-Ala-OH
C	Fmoc-Cys(Trt)-OH
D	Fmoc-Asp(OtBu)-OH
E	Fmoc-Glu(OtBu)-OH
F	Fmoc-Phe-OH
G	Fmoc-Gly-OH
H	Fmoc-His(Trt)-OH
I	Fmoc-Ile-OH
K	Fmoc-Lys(Boc)-OH
L	Fmoc-Leu-OH
M	Fmoc-Met-OH
N	Fmoc-Asn(Trt)-OH
P	Fmoc-Pro-OH
Q	Fmoc-Gln(Trt)-OH
R	Fmoc-Arg(Pmc)-OH
S	Fmoc-Ser(tBu)-OH
T	Fmoc-Thr(tBu)-OH

U	Fmoc- β -Alanin-OH
V	Fmoc-Val-OH
W	Fmoc-Trp-OH
Y	Fmoc-Tyr(tBu)-OH
Z	Fmoc- ϵ -Aminocapronsäure-OH
Nle	Fmoc- ϵ -Norleucin-OH
Abu	Fmoc- γ -Aminobuttersäure-OH

Die Einführung von Metallchelat- und Biotingruppen in die Peptidsequenz erfolgte durch direkten Einbau von Metallchelat- oder Biotin-gekoppelten Aminosäurederivaten, z.B. innerhalb der Sequenz über einen mit Metallchelat-Aktivester ϵ -derivatisierten Lysinrest (Abb. 1) bzw. über einen mit Biotin derivatisierten Lysinrest (Abb. 2) oder N-terminal durch Verwendung eines entsprechenden α -derivatisierten Aminosäurerests.

Die Aminosäuren oder Aminosäurederivate wurden in N-Methylpyrrolidon gelöst. Das Peptid wurde an 400-500 mg 4-(2',4'-Dimethoxyphenyl-Fmoc-Aminomethyl)-Phenoxy-Harz (Tetrahedron Letters 28 (1987), 2107) mit einer Beladung von 0,4-0,7 mmol/g aufgebaut (JACS 95 (1973), 1328). Die Kupplungsreaktionen wurden bezüglich des Fmoc-Aminosäurederivats mit 4 Äquivalenten Dicyclohexylcarbodiimid und 4 Äquivalenten N-Hydroxybenzotriazol in Dimethylformamid als Reaktionsmedium während 20 min durchgeführt. Nach jedem Syntheseschritt wurde die Fmoc-Gruppe mit 20%igem Piperidin in Dimethylformamid in 20 min abgespalten.

Die Freisetzung des Peptids vom Träger und die Abspaltung der säurelabilen Schutzgruppen erfolgte mit 20 ml Trifluoressigsäure, 0,5 ml Ethandithiol, 1 ml Thioanisol, 1,5 g Phenol und 1 ml Wasser in 40 min bei Raumtemperatur. Die Reaktionslösung wurde anschließend mit 300 ml gekühltem Diisopropylether versetzt und zur vollständigen Fällung des Peptids 40 min bei 0°C gehalten. Der Niederschlag wurde abfiltriert, mit Diisopropylether nachgewaschen, mit wenig 50 %-iger Essigsäure gelöst und lyophilisiert.

Das erhaltene Rohmaterial wurde mittels präparativer HPLC an Delta-PAK RP C18-Material (Säule 50 x 300 mm, 100 Å, 15 µ) über einen entsprechenden Gradienten (Eluent A: Wasser, 0,1% Trifluoressigsäure, Eluent B: Acetonitril, 0,1% Trifluoressigsäure) in ca. 120 min. aufgereinigt. Die Identität des eluierten Materials wurde mittels Ionenspray-Massenspektrometrie geprüft.

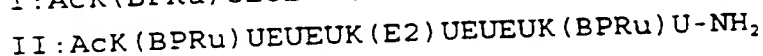
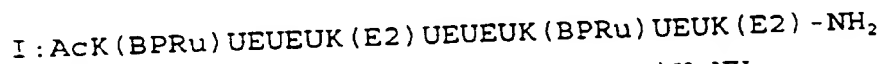
Die Entfernung von säurestabilen Phenylacetylschutzgruppen erfolgte enzymatisch mit immobilisierter oder löslicher Penicillin G-Amidase in wässriger Lösung mit organischem Solvensanteil bei Raumtemperatur.

Beispiel 3

Kopplung mit Haptenen

Das Metallchelate-markierte bzw. biotinylierte Peptid wurde in Dimethylformamid gelöst und bezüglich der kupplungsfähigen Positionen des Peptids (z.B. Aminoseitengruppen von Lysin) jeweils ein leichter Überschuß (ca. 30 %) des aktivierten Haptens (z.B. N-Hydroxysuccinimidester) zugefügt. Es wurde für 1 Stunde bei Raumtemperatur gerührt, das Lösungsmittel im Hochvakuum abgezogen und das Peptid über präparative HPLC gereinigt.

Unter Verwendung des in Abb. 1 gezeigten Metallchelate-Lysin-Derivats als Markierungsgruppe und von Estradiol (E2) als Hapten wurden Konjugate mit der folgenden Struktur hergestellt:



Das Konjugat I ist in Abb. 3 dargestellt. Der Aminoterminus der Peptidketten ist durch Acetyl (Ac) geschützt. Der Carboxylterminus liegt als Säureamidgruppe vor.

Die Metallchelate- und Haptenmoleküle sind jeweils über die ε-Aminoseitengruppe der Lysine an die Peptidkette gekoppelt.

Auf analoge Weise wurde unter Verwendung von Testosteron als Haptenmolekül ein Konjugat mit der Sequenz von Konjugat I synthetisiert.

Die Struktur der hergestellten Konjugate wurde durch ^1H -NMR (500 MHz) überprüft und bestätigt.

Beispiel 4

Bestimmung von Estradiol in Serum

Es wurde ein kompetitiver Zweischnitt-Assay nach dem "labelled analog"-Format zur Bestimmung von Estradiol in Humanserum durchgeführt. Hierzu wurden 90 μl Lösung 1 (0,69 nmol/l erfindungsgemäßes Konjugat I (Abb. 3) bzw. 1,68 nmol/l Vergleichskonjugat (Abb. 4), jeweils in 50 mmol/l 4-Morpholinethansulfonsäure (MES), pH 6,8, 0,1 % Rinderserumalbumin, 0,1 % Thesit, 0,01 % Methylisothiazolon, 0,1 % Oxypyron, 30 ng/ml Ablösereagenz Dihydrotestosteron) zusammen mit 50 μl Probe (Serumprobe oder Estradiol Standard) in einem Polystyrolgefäß 10 min bei 37°C inkubiert. Anschließend erfolgte die aufeinanderfolgende Zugabe von 90 μl Lösung 2 (0,7 $\mu\text{g/ml}$ bzw. 1,4 $\mu\text{g/ml}$ Konjugat aus Biotin und polyklonalem Anti-Estradiol-Kaninchen-Fab' in 50 mmol/l MES-Puffer pH 6,0) und 50 μl Bead-Suspension (720 $\mu\text{g/ml}$ Streptavidin-beschichtete Magnetpartikel, Fa. Dynal).

Nach weiteren 10 min Inkubation bei 37°C wurden 150 μl der Mischung in eine Meßzelle überführt. Dort erfolgte eine magnetische Konzentrierung der Bead-Partikel und der daran haftenden Rutheniummarkierung an die Elektrodenoberfläche und eine Detektion des elektrochemisch erzeugten Chemilumineszenzsignals bei 28°C.

Das in Tabelle 2 dargestellte Ergebnis dieses Versuchs zeigt, daß das erfindungsgemäße Konjugat gegenüber dem Vergleichskonjugat eine deutliche Verbesserung der Testperformance hinsichtlich Sensitivität und unterer Nachweisgrenze bringt.

Tabelle 2

Antigen	Konjugat I (Erfindung)	Konjugat (Ver- gleich)
Antigenkonzentration (nmol/l)	0,69	1,68
Rutheniumkomplex-Konzentra- tion (nmol/l)	1,68	1,68
Konzentration Antiserum (μ g/ml)	0,7	1,4
Counts Standard F	80412	87709
Counts Standard B	653420	1224219
Counts Standard A	861140	1445270
Verhältnis B/A	0,759	0,847
Verhältnis F/A	0,093	0,061
Verhältnis F/E	0,546	0,442
untere Nachweisgrenze pg/ml (3 % VK)	15,9	25,1

PATENTANSPRÜCHE

1. Konjugat, umfassend einen polymeren Träger mit maximal 100 monomeren Einheiten, der gekoppelt an reaktive Seitengruppen 1 - 10 Haptenmoleküle und 1 - 10 Markierungs- oder Festphasenbindungsgruppen enthält, wobei die monomeren Einheiten aus Aminosäuren, Nukleotiden, Nukleotidanaloga und peptidischen Nukleinsäuren ausgewählt sind.
2. Konjugat nach Anspruch 1,
dadurch gekennzeichnet,
daß der polymere Träger eine Länge von 3 - 80 monomeren Einheiten aufweist.
3. Konjugat nach Anspruch 1 oder 2,
dadurch gekennzeichnet,
daß der polymere Träger eine Länge von 5 - 60 monomeren Einheiten aufweist.
4. Konjugat nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
daß es 1 - 6 Haptenmoleküle enthält.
5. Konjugat nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
daß es 2 - 8 Markierungs- oder Festphasenbindungsgruppen enthält.
6. Konjugat nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
daß der polymere Träger eine aus Aminosäuren aufgebaute Peptidkette umfaßt.
7. Konjugat nach einem der Ansprüche 1-5,
dadurch gekennzeichnet,

daß der polymere Träger eine aus Nukleotiden oder/und Nukleotidanaloga aufgebaute Kette umfaßt.

8. Konjugat nach einem der Ansprüche 1-5,
dadurch gekennzeichnet,
daß der polymere Träger eine aus peptidischen Nukleinsäuren aufgebaute Kette umfaßt.
9. Konjugat nach Anspruch 7 oder 8,
dadurch gekennzeichnet,
daß der polymere Träger als Doppelstrang vorliegt.
10. Konjugat nach Anspruch 9,
dadurch gekennzeichnet,
daß der Doppelstrang mindestens eine Kette enthält, die peptidische Nukleinsäuren umfaßt.
11. Konjugat nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Haptenmoleküle und Markierungs- bzw. Festphasenbindungsgruppen über reaktive Amino- oder/und Thiol-Seiten-
gruppen an den polymeren Träger gekoppelt sind.
12. Konjugat nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
daß es Markierungsgruppen enthält, die aus lumineszierenden Metallchelaten oder Fluoreszenzgruppen ausgewählt sind.
13. Konjugat nach einem der Ansprüche 1 bis 11,
dadurch gekennzeichnet,
daß es Festphasenbindungsgruppen enthält, die aus Biotin und Biotinanaloga ausgewählt sind.
14. Konjugat nach Anspruch 12,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Markierungsgruppen lumineszierende Metallchelate sind und der polymere Träger mindestens einen positiven

oder/und negativen Ladungsträger enthält.

15. Konjugat nach Anspruch 12,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Markierungsgruppen Fluoreszenzgruppen sind und
polymere Träger eine im wesentlichen helikale Struktur
aufweist.
16. Konjugat nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
daß das Hapten ein immunologisch reaktives Molekül mit
einer Molekularmasse ≤ 2000 Da ist.
17. Konjugat nach Anspruch 16,
dadurch gekennzeichnet,
daß das Hapten aus pharmakologischen Wirkstoffen, Hormonen,
Metaboliten, Vitaminen, Mediatoren und Neurotransmittern
ausgewählt ist.
18. Konjugat nach einem der Ansprüche 1 bis 15,
dadurch gekennzeichnet,
daß das Hapten aus immunologisch reaktiven Peptidepitopen
mit einer Länge bis zu 30 Aminosäuren ausgewählt ist.
19. Konjugat nach einem der Ansprüche 1 bis 15,
dadurch gekennzeichnet,
daß das Hapten aus Nukleinsäuren mit einer Länge bis zu 50
Nukleotiden ausgewählt ist.
20. Konjugat nach einem der Ansprüche 1 bis 15,
dadurch gekennzeichnet,
daß das Hapten aus peptidischen Nukleinsäuren mit einer
Länge bis zu 50 Monomereinheiten ausgewählt ist.
21. Verfahren zur Herstellung von Konjugaten nach einem der
Ansprüche 1 bis 20,
dadurch gekennzeichnet,

daß man einen polymeren Träger aus monomeren Einheiten an einer Festphase synthetisiert, wobei man

- (a) während der Synthese an vorbestimmten Positionen des Trägers Monomerderivate einführt, die kovalent mit Haptenmolekülen oder/und Markierungs- bzw. Festphasenbindungsgruppen gekoppelt sind, oder/und
- (b) nach der Synthese aktivierte Haptenmoleküle oder/und Markierungs- bzw. Festphasenbindungsgruppen an reaktive Seitengruppen des Trägers koppelt.

- 22. Verfahren nach Anspruch 21,
dadurch gekennzeichnet,
daß man einen Peptidträger aus Aminosäurederivaten synthetisiert.
- 23. Verfahren nach Anspruch 21 oder 22,
dadurch gekennzeichnet,
daß in Variante (a) die Haptenmoleküle oder/und Markierungs- bzw. Festphasenbindungsgruppen jeweils an eine primäre Aminogruppe oder eine Thiolgruppe des Monomerderivats gekoppelt sind.
- 24. Verfahren nach Anspruch 21 oder 22,
dadurch gekennzeichnet,
daß in Variante (b) die Kopplung an Amino- oder/und Thiol-Seitengruppen des Trägers nach Abspaltung von Schutzgruppen der zur Festphasensynthese verwendeten Monomerderivate erfolgt.
- 25. Verfahren nach Anspruch 21, 22 oder 24,
dadurch gekennzeichnet,
daß man nach der Synthese in Variante (b) die Haptenmoleküle und Markierungs- bzw. Festphasenbindungsgruppen an primäre Aminoseitengruppen des Trägers koppelt, wobei an Positionen des Trägers, an denen eine Kopplung mit Haptenmolekülen erfolgen soll, ein Monomerderivat mit einer ersten Schutzgruppe für die Amino-Seitengruppe verwendet

wird, und an Positionen des Trägers, an denen eine Kopplung mit Markierungs- bzw. Festphasenbindungsgruppen erfolgen soll, ein Monomerderivat mit einer zweiten Schutzgruppe für die Aminoseitengruppe verwendet wird und die erste und die zweite Schutzgruppe so ausgewählt werden, daß eine selektive Schutzgruppenabspaltung möglich ist.

26. Verfahren nach Anspruch 25,
dadurch gekennzeichnet,
daß die erste und zweite Schutzgruppe aus säurelabilen bzw. säurestabilen Schutzgruppen ausgewählt werden.
27. Verwendung von Konjugaten nach einem der Ansprüche 1 bis 20 als Antigen in einem immunologischen Verfahren oder zur Nukleinsäure-Diagnostik.
28. Verwendung nach Anspruch 27,
dadurch gekennzeichnet,
daß man Konjugate, die mehr als 1 Haptenmolekül enthalten, als Polyhaptene in immunologischen Nachweisverfahren einsetzt.
29. Verwendung nach Anspruch 27 oder 28 in einem kompetitiven Immunoassay.
30. Verwendung nach Anspruch 27 oder 28 in einem Immunoassay zum Nachweis spezifischer Antikörper.
31. Verfahren zum Nachweis eines Analyten in einer Probe-
flüssigkeit nach dem Prinzip des kompetitiven Immunoassay
im "labelled analog" Format,
dadurch gekennzeichnet,
daß man
 - (a) die Probeflüssigkeit in Gegenwart einer reaktiven Festphase mit einem Konjugat nach einem der Ansprüche 1 bis 20, das eine Markierungsgruppe enthält, und einem Rezeptor, der an die Festphase gebunden oder zur

Bindung an eine Festphase fähig ist und eine spezifisch immunologische Reaktion mit dem Analyten und der Haptenkomponente des Konjugats eingehen kann, inkubiert,

- (b) die Festphase gegebenenfalls von der Inkubationsflüssigkeit abtrennt und
- (c) das Vorhandensein oder/und die Menge des Analyten in der Probeflüssigkeit durch Messung der Markierungskomponente des Konjugats in der Festphase oder/und in der Inkubationsflüssigkeit bestimmt.

32. Verfahren nach Anspruch 31,

dadurch gekennzeichnet,

daß man als Rezeptor einen biotinylierten Antikörper bzw. ein biotinyliertes Antikörperfragment und eine mit Streptavidin oder Avidin beschichtete Festphase verwendet.

33. Verfahren zum Nachweis eines Analyten in einer Probeflüssigkeit nach dem Prinzip des kompetitiven Immunoassay im "labelled antibody" Format,

dadurch gekennzeichnet,

daß man

- (a) die Probeflüssigkeit in Gegenwart einer reaktiven Festphase mit einem Konjugat nach einem der Ansprüche 1 bis 20, das eine Festphasenbindungsgruppe enthält, und einem Rezeptor, der eine Markierungsgruppe trägt und eine spezifisch immunologische Reaktion mit dem Analyten und der Haptenkomponente des Konjugats eingehen kann, inkubiert,
- (b) die Festphase gegebenenfalls von der Inkubationsflüssigkeit abtrennt und
- (c) das Vorhandensein oder/und die Menge des Analyten in der Probeflüssigkeit durch Messung der Markierungskomponente des Rezeptors in der Festphase oder/und in der Inkubationsflüssigkeit bestimmt.

34. Verfahren nach Anspruch 33,
dadurch gekennzeichnet,
daß man ein biotinyliertes Konjugat und eine mit Streptavidin oder Avidin beschichtete Festphase verwendet.
35. Verfahren zum Nachweis eines spezifischen Antikörpers in einer Probeflüssigkeit,
dadurch gekennzeichnet,
daß man
- (a) die Probeflüssigkeit mit mindestens einem Konjugat nach einem der Ansprüche 1 bis 20, das gegen den zu bestimmenden Antikörper gerichtet ist, inkubiert und
 - (b) den Antikörper über eine Bindung mit dem Konjugat nachweist.
36. Verfahren nach Anspruch 35,
dadurch gekennzeichnet,
daß man
- (a) die Probeflüssigkeit in Gegenwart einer reaktiven Festphase und zwei gegen den zu bestimmenden Antikörper gerichteten Antigenen inkubiert, wobei das erste Antigen eine Markierungsgruppe trägt und das zweite Antigen an die Festphase gebunden oder in einer an die Festphase bindefähigen Form vorliegt,
 - (b) die Festphase gegebenenfalls von der Inkubationsflüssigkeit abtrennt und
 - (c) das Vorhandensein oder/und die Menge des Antikörpers durch Bestimmung der Markierung in der Festphase oder/und in der flüssigen Phase nachweist,
- wobei man als erstes oder/und zweites Antigen ein Konjugat nach einem der Ansprüche 1 bis 20 verwendet.
37. Verfahren nach Anspruch 36,
dadurch gekennzeichnet,
daß man als erstes Antigen ein mit einem lumineszierenden Metallchelat oder einer Fluoreszenzgruppe markiertes Konjugat verwendet.

38. Verfahren nach Anspruch 36 oder 37,
dadurch gekennzeichnet,
daß man als zweites Antigen ein biotinyliertes Konjugat und
eine mit Streptavidin oder Avidin beschichtete Festphase
verwendet.

1/2

Abb.1

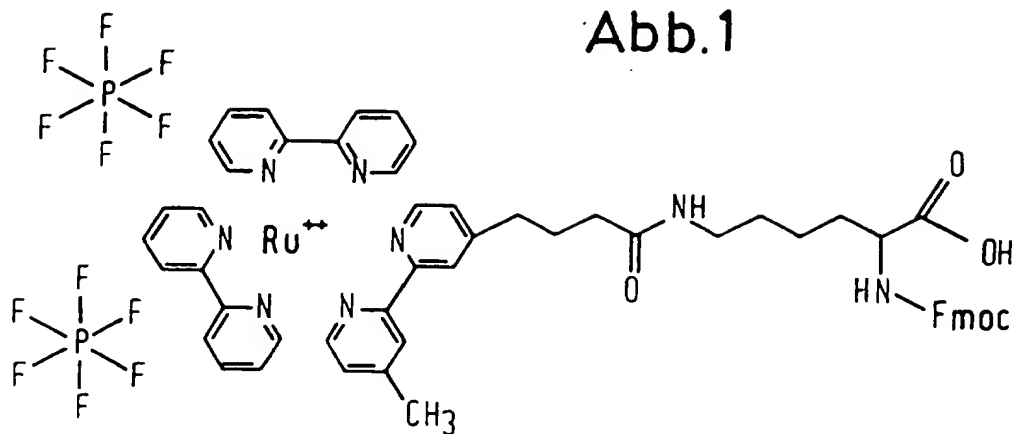
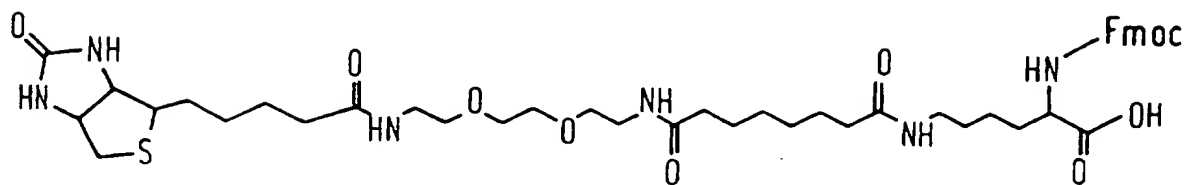


Abb.2



2/2

Abb. 3

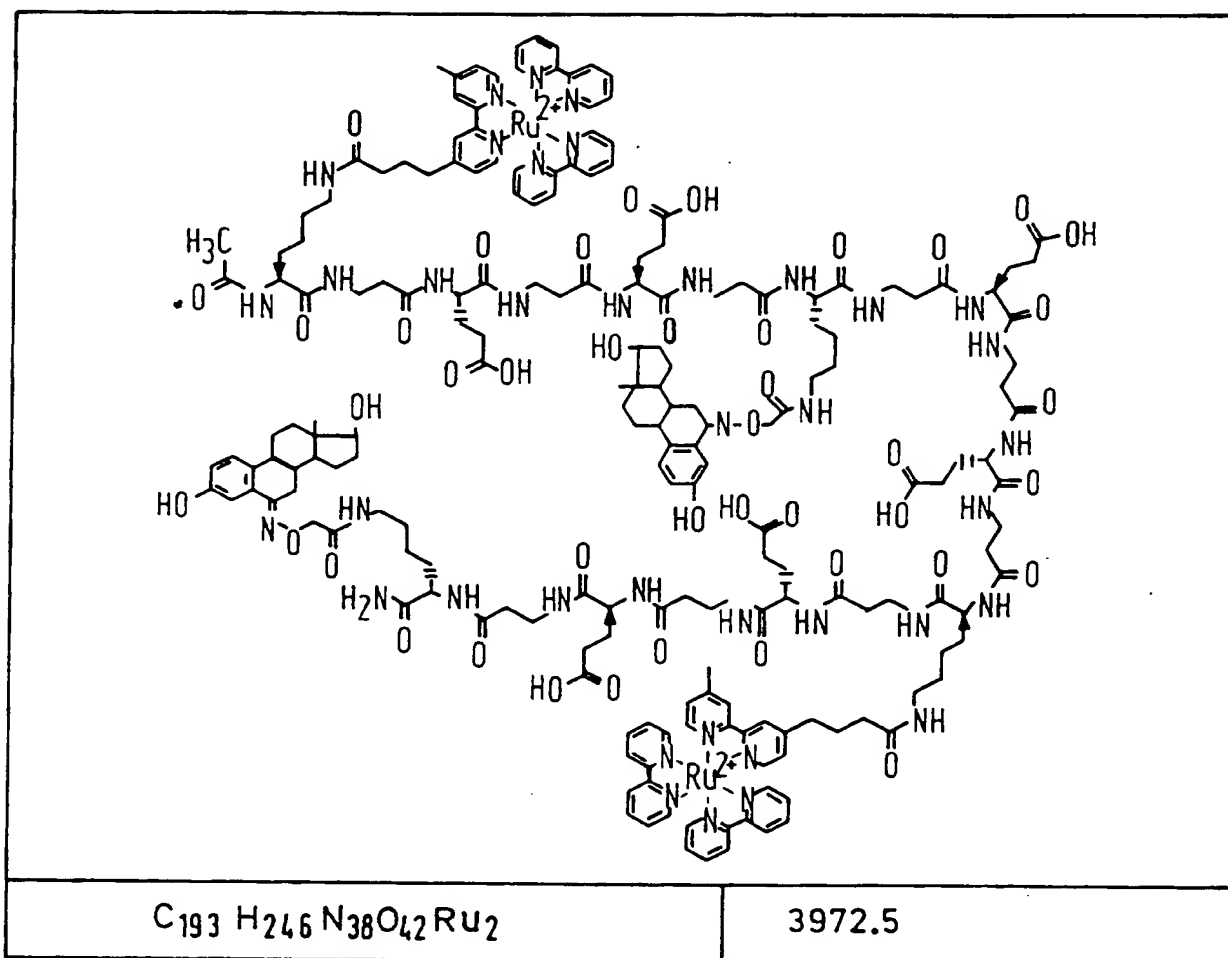
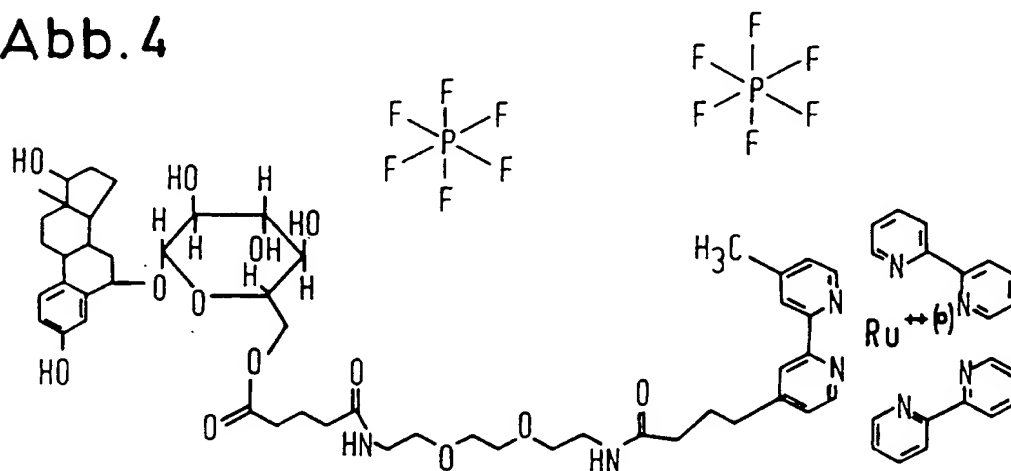


Abb. 4



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PC/EP 95/02915

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 G01N33/532 G01N33/533 G01N33/58 C12Q1/68 G01N33/543

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 G01N C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	ANALYTICAL BIOCHEMISTRY, vol. 193, no. 2, March 1991 NEW YORK US, pages 272-279, R. BREDEHORST ET AL. 'Novel trifunctional carrier molecule for the fluorescent labeling of haptens.'	1-6, 11, 12, 16
Y	see the whole document ---	7-38
X	EP,A,0 135 071 (HENNING BERLIN GMBH CHEMIE UND PHARMAWERK) 27 March 1985	1-6, 11, 12, 16, 17
Y	see the whole document ---	7-38
Y	EP,A,0 507 587 (SYNTEX (U.S.A.) INC.) 7 October 1992 cited in the application see the whole document ---	7-38

-/--

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- * 'A' document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- * 'E' earlier document but published on or after the international filing date
- * 'L' document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- * 'O' document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- * 'P' document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- * 'T' later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- * 'X' document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- * 'Y' document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- * '&' document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

14 November 1995

Date of mailing of the international search report

23. 11. 95

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+ 31-70) 340-3016

Authorized officer

Griffith, G

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PC/EP 95/02915

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	EP,A,0 178 450 (F. HOFFMANN-LA ROCHE & CO. AG.) 23 April 1986 cited in the application see the whole document ---	7-38
Y	EP,A,0 154 884 (MOLECULAR DIAGNOSTICS, INC.) 18 September 1985 cited in the application see the whole document ---	7-38
A	EP,A,0 155 224 (CHROMAGENICS, INC.) 18 September 1985 see the whole document -----	1-38

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PC./EP 95/02915

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP-A-135071	27-03-85	EP-A, B 0134307	20-03-85
		JP-A- 60070359	22-04-85
		JP-C- 1831702	29-03-94
		JP-A- 60173469	06-09-85
		US-A- 4645646	24-02-87
		US-A- 4657873	14-04-87
EP-A-507587	07-10-92	JP-A- 5126829	21-05-93
EP-A-178450	23-04-86	CA-A- 1261744	26-09-89
		JP-B- 6090201	14-11-94
		JP-A- 61073066	15-04-86
		US-A- 5075447	24-12-91
		US-A- 4745076	17-05-88
		AU-B- 586831	27-07-89
		AU-B- 4733485	27-03-86
EP-A-154884	18-09-85	US-A- 4748111	31-05-88
		AU-B- 578933	10-11-88
		AU-B- 3943485	19-09-85
		JP-A- 60226900	12-11-85
EP-A-155224	18-09-85	JP-A- 60218071	31-10-85

INTERNATIONALLER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PC/EP 95/02915

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 6 G01N33/532 G01N33/533 G01N33/58 C12Q1/68 G01N33/543

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 6 G01N C12Q

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehorende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	ANALYTICAL BIOCHEMISTRY, Bd. 193, Nr. 2, März 1991 NEW YORK US, Seiten 272-279, R. BREDEHORST ET AL. 'Novel trifunctional carrier molecule for the fluorescent labeling of haptens.'	1-6,11, 12,16
Y	siehe das ganze Dokument ---	7-38
X	EP,A,0 135 071 (HENNING BERLIN GMBH CHEMIE UND PHARMAWERK) 27.März 1985	1-6,11, 12,16,17
Y	siehe das ganze Dokument ---	7-38
Y	EP,A,0 507 587 (SYNTEX (U.S.A.) INC.) 7.Oktober 1992 in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument ---	7-38
	-/--	

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

- * 'A' Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
- * 'E' älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
- * 'L' Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
- * 'O' Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
- * 'P' Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

* 'T' Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

* 'X' Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

* 'Y' Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

* 'Z' Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

14.November 1995

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

23. 11. 95

Name und Postanschrift der Internationale Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+ 31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Griffith, G

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PC1/EP 95/02915

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	EP,A,0 178 450 (F. HOFFMANN-LA ROCHE & CO. AG.) 23.April 1986 in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument ---	7-38
Y	EP,A,0 154 884 (MOLECULAR DIAGNOSTICS, INC.) 18.September 1985 in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument ---	7-38
A	EP,A,0 155 224 (CHROMAGENICS, INC.) 18.September 1985 siehe das ganze Dokument -----	1-38

INTERNATIONALE RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichung, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 95/02915

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
EP-A-135071	27-03-85	EP-A, B 0134307	20-03-85
		JP-A- 60070359	22-04-85
		JP-C- 1831702	29-03-94
		JP-A- 60173469	06-09-85
		US-A- 4645646	24-02-87
		US-A- 4657873	14-04-87
EP-A-507587	07-10-92	JP-A- 5126829	21-05-93
EP-A-178450	23-04-86	CA-A- 1261744	26-09-89
		JP-B- 6090201	14-11-94
		JP-A- 61073066	15-04-86
		US-A- 5075447	24-12-91
		US-A- 4745076	17-05-88
		AU-B- 586831	27-07-89
		AU-B- 4733485	27-03-86
EP-A-154884	18-09-85	US-A- 4748111	31-05-88
		AU-B- 578933	10-11-88
		AU-B- 3943485	19-09-85
		JP-A- 60226900	12-11-85
EP-A-155224	18-09-85	JP-A- 60218071	31-10-85